# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12O 1/68, 1/02, G01N 33/50

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/01644

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

16. Januar 1997 (16.01.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE96/01183

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. Juni 1996 (27.06.96)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

(30) Prioritätsdaten:

195 25 285.3

28. Juni 1995 (28.06.95)

DE

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

sleben (DE).

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOBUS, Anna, Magdalene [DE/DE]; Liebigweg 7, D-06466 Gatersleben (DE). FRANZ, Wolfgang-Michael [DE/DE]; Fasanenring 15b, D-23627 Groß Gronau (DE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gater-

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Roessle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(54) Title: IN VITRO TEST PROCEDURE FOR DETECTING CHEMICALLY-INDUCED EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC **EFFECTS** 

ZUM NACHWEIS CHEMIKALIEN-INDUZIERTER EMBRYOTOXIS-(54) Bezeichnung: IN VITRO-TESTVERFAHREN CHER/TERATOGENER EFFEKTE

#### (57) Abstract

The invention concerns an in vitro test procedure for the detection of chemically induced effects on embryonic development and for differentiation for the purpose of embryotoxicity/teratogenicity screening based on differentiated pluripotent embryonic stem (ES) cells from mice and rats and using embryonic germ (EG) cells obtained from primoridial germ cells. The proposed test procedure is characterised in that stable transgenic ES or EG cell clones containing tissue-specific promoters and reporter genes are selected, differentiation-dependent expression of tissue-specific genes is carried out following differentiation of ES cells in the presence of embryotoxic substances acting at specific times into different germination path derivatives; this is followed by detection of chemically induced activation, repression or modulation of tissue-specific genes which regulate embryonic development.

### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein in vitro-Testverfahren zum Nachweis von Chemikalien-induzierten Effekten auf die embryonale Entwicklung und Differenzierung für ein Embryotoxizitäts-/Teratogenitäts-Screening auf der Basis differenzierter pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen der Maus und Ratte sowie an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen. Das erfindungsgemäße Testverfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß stabile transgene ES- oder EG-Zell-Klone, die gewebespezifische Promotoren und Reportergene enthalten, selektiert werden, eine differenzierungsabhängige Expression gewebespezifischer Gene nach Differenzierung von ES-Zellen in Anwesenheit von zu bestimmten Zeiten einwirkenden embryotoxischen Substanzen in verschiedene Kelmbahnderivate erfolgt und anschließend die Chemikalien-induzierte Aktivierung, Reprimierung oder Modulation gewebespezifischer und die Embryonalentwicklung regulierender Gene nachgewiesen wird.

> Serial No. 09/457,931 Docket No. 441472000100

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenica	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados .	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungaru	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen .
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ .	Benin	JP	Japan	RO	Rumānien
BR	Brasilien	KŒ	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kenada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI.	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
cs	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
cz	Tschechische Republik	ĹV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dinemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerik
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

WO 97/01644 PCT/DE96/01183

1

In vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein in vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer(z.B. auch teratogener) Effekte auf der Basis differenzierender pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen der Maus und Ratte sowie an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen.

Der Nachweis teratogener Eigenschaften von chemischen Wirkstoffen erfolgt derzeit durch Bestimmungen der Reproduktionstoxizität von Prüfsubstanzen nach Einfach- und Mehrfachapplian trächtigen Laborsäugern und durch Prüfungen der Embryotoxizität in frühen Stadien der Schwangerschaft (Holz und Siegemund, Der Einsatz von Tieren in der Forschung und Entwicklung im Verbraucher- und Umweltschutz, Abschlußbericht zur Basiserhebung des Batelle-Instituts 1988). Des Weiteren werden in vitro-Versuche mit Säuger-Embryonen (Neubert und Merker, Cell culture techniques - applicability for studies on prenatal differentiation and toxicity, de Gruyter, Berlin - New York (1981)) und embryonalen Organen für Teratogenitätsteste eingesetzt. Diese Testverfahren haben jedoch den großen Nachteil, daß sie nach wie vor den Einsatz einer großen Anzahl von lebenden Säugern, insbesondere Ratten und Mäusen voraussetzen. In vitro-Testverfahren, bei denen Primärzellkulturen aus Extremitätenknospen (z.B. "limb buds", Kochhar, Teratology 11, 273-287 (1975)), oder Gehirnanlagen embryonaler Ratten (Flint and Orton, Toxicol. Appl. Pharmacol. 76, 383-395 (1984)) oder permanente Zellinien aus embryonalen oder adulten Säugetiergeweben oder aus menschlichen Geweben, wie Tumorzellen des Ovars oder embryonale Gaumenzellen eingesetzt wurden, erfüllen im engeren Sinn nicht die Anforderungen, die an Teratogenitätstests gestellt werden, nämlich Hinweise auf mögliche Entwicklungsstörungen während der Embryogenese zu geben.

WO 97/01644

Seit einigen Jahren gibt es Bemühungen, permanente Kulturen totipotenter/pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) auch zum Nachweis embryotoxischer und mutagener Stoffe zu verwenden (Laschinski et al, Reproductive Toxicol. 5, 57-65 (1991), Newall and Beedles, Toxicol. in Vitro 8, 697-701 (1994), Sehlmeyer and Wobus, Mutation Res. 324, 69-76 (1994)). Embryonale Stammzellen sind die totipotenten Zellen des frühen Embryos, aus denen sich der komplette Säugetierorganismus entwickelt. Störungen während der Keimblatt- und pränatalen Entwicklung können zum Absterben der Embryonen (präimplantativem Tod), zu Entwicklungsstörungen, Fehlentwicklungen bzw. Mißbildungen führen.

Als in vitro-Systeme totipotenter bzw. pluripotenter Zellen sind 1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen), permanente Linien totipotenter embryonaler Zellen (Evans and Kaufman, Nature 282, 507-509 (1981)) und

2. Embryonale Keimzellen ("embryonic germ cells", EG-Zellen), die aus primordialen Keimzellen (PGC) ca. 9 Tage alter Embryonen gewonnen und als permanente Zellinien kultiviert werden (Stewart et al, Dev. Biol. 161,626-628 (1994)) bekannt.

Sowohl ES-Zellen als auch EG-Zellen sind totipotent und nehmen in vivo nach Retransfer in die Blastozyste an der normalen Embryogenese teil und sind in der Lage, die Keimbahn zu kolonisieren (Bradley et al, Nature Bd. 309, 255-256 (1984), Matsui et al, Cell 70, 841-847 (1992)).

In vitro können ES-Zellen nach Differenzierung in Embryo-ähnlichen Aggregaten, sogenannten "embryoid bodies" Derivate aller drei Keimblätter bilden, d.h. in kardiogene (Doetschmann et al, J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27-45 (1985)), myogene (Rohwedel et al, Dev. Biol. 164, 87-101 (1994), neuronale und hämatopoietische Zellen (Wiles and Keller, Development 111, 259-267 (1991)) differenzieren.

In bisherigen Experimenten wurde nachgewiesen, daß das Teratogen

Retinsäure (RA) zu gravierenden Veränderungen der Expression gewebespezifischer Gene führt, wenn es zu bestimmten Zeiten der "embryoid body"-Differenzierung einwirkte und zu Aktivierung, Hemmung oder Modulation der Expression von Herz- oder Skelettmuskel-spezifischen Genen führte (Wobus et al., Roux's Arch. Dev. Biol. 204, 1994, 36-45). Diese Aktivierung, Reprimierung oder Modulation der Genexpression kann auch über Reportergene, z. B. X-Gal oder Luziferase, sichtbar gemacht werden.

Bisherige in vitro-Verfahren mit ES-Zellen betreffen in erster Linie Testverfahren zum Nachweis der zytotoxischen Wirksamkeit embryotoxischer Verbindungen mit Hilfe des MTT-Testes (Laschinski et al s.o.). Dabei wurde in ES-Zellen eine höhere zytotoxische Sensitivität beobachtet als in differenzierten Zellen.

Untersuchungen zur Zytotoxizität mit Hilfe des "stem cell tests" zum Nachweis teratogener Effektivität wurden von Newall and Beedles, Toxicol. in Vitro 8, 697-701 (1994) beschrieben.

In allen diesen Untersuchungen dienten zytotoxische Effekte als Maß für embryoschädigende Eigenschaften teratogener/embryotoxischer Substanzen.

Es ist festzustellen, daß ES-Zellen das zur Zeit wichtigste Zellmodell in der Entwicklungsbiologie sind, vor allem zur Konstruktion transgener Organismen, ihr Einsatz in der Reproduktions- und Gentoxikologie bisher jedoch begrenzt ist.

Die Erfindung hat das Ziel, ein routinemäßig einsetzbares in vitro-Testverfahren zur Ermittlung Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte bereit zu stellen.

Die Aufgabe der Erfindung liegt darin, ein in vitro-Testverfahren zum Nachweis embryotoxischer/teratogener Eigenschaften von chemischen Wirkstoffen an embryonalen Stamm(ES)-Zellen oder an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen zu entwickeln. Das Testverfahren soll insbesondere geeignet sein, Hinweise auf mögliche Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen während der Embryogenese zu geben.

WO 97/01644 PCT/DE96/01183

4

Die Erfindung wird gemäß der Ansprüche realisiert.

Es werden stabile transgene ES- oder EG-Stammzellklone konstruiert, bei denen ein bakterielles Reportergen Lacz oder das Luziferasegen unter die Kontrolle von gewebespezifischen Promotoren oder Entwicklungskontrollgenen gebracht wird. Nach Differenzierung der ES-Zellen in Anwesenheit teratogener Substanzen in die verschiedenen Keimbahnderivate erfolgt eine differenzierungsanhängige Expression in den Zellen, die die gewebespezifischen Promotoren exprimieren. Die Aktivierung, Reprimierung oder Modulation dieser gewebespezifischen Gene wird mit einer einfachen Färbereaktion, dem X-Gal Assay, bestimmt. Mit der Erfindung wird eine Batterie von relevanten Test-ES-Zellklonen entwickelt, die neben dem Reportergen LacZ (und einer Neomycinkassette zur Selektion stabiler Transfektanten) Promotorsequenzen enthalten, die charakteristische und wesentliche Merkmale der ektodermalen und mesodermalen Linie regulieren. Das sollten insbesondere Gene sein, die die neuronale, kardiogene, die Muskel- und die Skelettentwicklung determinieren. Nach Transfektion dieser Vektoren in pluripotente ES-/EG-Zellen der Maus oder der Ratte werden stabile Stammzellklone selektiert und diese nach "embryoid body"-Entwicklung zu spezifischen Zeiten in Anwesenheit von Testsubstanzen differenziert (Abb.1). Danach kann die differenzierungsabhängige Expression der gewebespezifischen Gene mit Hilfe der X-Gal-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstadien (unter Zeiteinhaltung und Einsatz dafür geeigneter Vektoren) nachgewiesen werden. Diese Färbetechnik ist standardisierbar und über photometrische Verfahren automatisierbar.

Mit diesem Testverfahren ist es möglich, in vitro Chemikalieninduzierte Veränderungen der zellulären Differenzierung, die
während der Keimblattdifferenzierung und frühen embryonalen
Entwicklung stattfinden und zu Entwicklungsstörungen führen,
festzustellen. Bei dem erfindungsgemäßen Testverfahren werden
keine lebenden Tiere, sondern permanente Zellinien eingesetzt.

Der wesentliche Vorteil der Erfindung besteht darin, daß ein standardisierbares, im Routine-Screening einsetzbares in vitro

5

Modell etabliert wird, das zu einer Einsparung von Versuchstieren führt. So wurden im Bereich der Reproduktionstoxikologie in Deutschland pro Jahr (1987) ca. 20 000 Säugetiere und Vögel eingesetzt. Darüber hinaus werden eine große Anzahl von Säugern zur Entnahme embryonaler Organe und Gewebe (embryonale Herzmuskelzellen, "limb bud" Kulturen, "micromass"-Assay u.a.) benötigt, so daß die Gesamtzahl bei Tierzahlen von mindestens 50 000 liegen dürfte.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können im Vorscreening folgende Testverfahren teilweise ersetzt und ergänzt werden:

- in vivo-Segment II-Studien,
- Teste mit embryonalen Organen ("limb bud" Kulturen) und Primärkulturen
- Testverfahren mit artifiziellen Embryonen

Anschließend wird die Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert, das die Anmeldung jedoch nicht beschränken soll.

### Beispiel 1

Das Testverfahren ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Es werden transgene ES-Zellklone, bei denen LacZ unter der Kontrolle des vetrikelspezifischen MCL-2V Promotors (Franz et al, Circ. Res. 73 (1993) 629-638) exprimiert wird, für die Untersuchung solcher kardiotoxischen Substanzen eingesetzt, die zu Entwicklungsstörungen am Herzen führen.

Zum Einsatz kommen Klone, die mit dem Vektor pGNA-MLC 2.1-LacZ transfiziert wurden und MLC-2V stabil exprimieren.

Während der mesodermalen Differenzierung in embryoid bodies wird die Testsubstanz Retinsäure (RA) zugegeben (z. B. von Tag 5 bis 15) und anschließend eine X-Gal-Färbung der differenzierten embryoid bodies durchgeführt.

Abb.2 zeigt die Aktivierung der MLC-2V-Expression im MLC-Klon 3 durch 10<sup>-8</sup>M (E,F)und 10<sup>-8</sup>M (C,D)RA nach Behandlung zwischen 5. und 15. Tag der embryoid body-Differenzierung. Die Kontrollzel-

WO 97/01644 PCT/DE96/01183

 $\epsilon$ 

len (A,B) zeigen X-Gal-Färbung ohne Induktion durch die teratogene Substanz RA.

Die Vektoren werden auch zur Transfektion von EG-Zellen oder von Ratten-ES-Zellen benutzt.

7

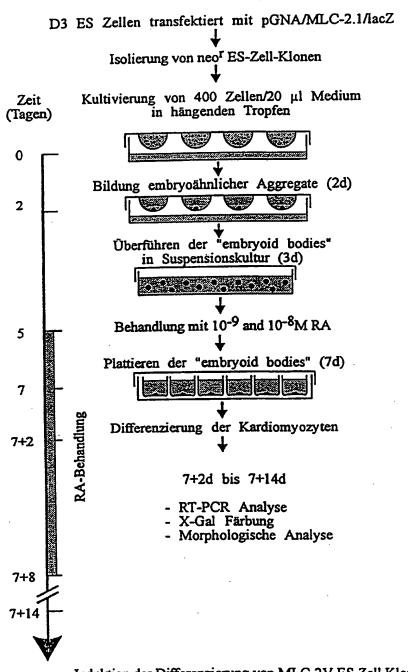
### Patentansprüche

- 1. In vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte auf der Basis differenzierender pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen oder an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen der Maus und Ratte durch
- Selektion stabiler transgener ES-/EG-Zell-Klone,
- differenzierungsabhängige Expression gewebespezifischer Gene von ES-/EG-Zell-Klonen in Anwesenheit von zu bestimmten Zeiten der in vitro Differenzierung einwirkenden teratogenen Substanzen und nachfolgende Differenzierung in die verschiedenen Keimbahnderivate und
- Nachweis der Chemikalien-induzierten Aktivierung, Reprimierung oder Modulation von gewebespezifischen und die Embryonalentwicklung beeinflussenden Genen.
- 2. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Konstruktion der transgenen Zell-Klone beliebige Reportergene, z.B. LacZ oder Luciferase, unter die Kontrolle von gewebespezifischen Promotoren, die zellspezifische Strukturgene, Transkriptionsfaktoren oder Entwicklungskontrollegene kontrollieren, gebracht werden.
- 3. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zell-Klone
- das Reportergen LacZ und eine Neomycinkassette zur Selektion stabiler Transfektanten sowie
- Promotorsequenzen von Genen, die charakteristische und wesentliche Merkmale der ektodermalen und mesodermalen Linie kodieren,

enthalten.

- 4. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Promotoren solche eingesetzt werden, die gewebespezifische Gene kodieren, wie z.B. Gene, die die neuronale Herz-, Muskel- oder Skelettentwicklung determinieren, oder Promotoren anderer Entwicklungskontrollgene (Hox oder Pax-Gene).
- 5. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Verlauf der Differenzierung durch exogene Testsubstanzen die Reportergenkonstrukte spezifisch aktiviert, reprimiert oder moduliert werden und daß die differenzierungsabhängige Expression im Testverfahren über "embryoid body" Differenzierung in verschiedene Linien, siehe 4, erfolgt.
- 6. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 6, dadurch gekennzeichnet, daß durch Einwirkung von Chemikalien das Expressionsmuster der Promotor-Reportergenkonstrukte beeinflußt und mit Hilfe der X-Gal-Färbung bestimmt wird.

# Protokoll zur kardiogenen Differenzierung



Induktion der Differenzierung von MLC-2V ES Zell Klonen in Kardi myozyten via "embryoid bodies" und RA Behandlung

SEP 0 7 200(1

TECH CENTER 1600/2900

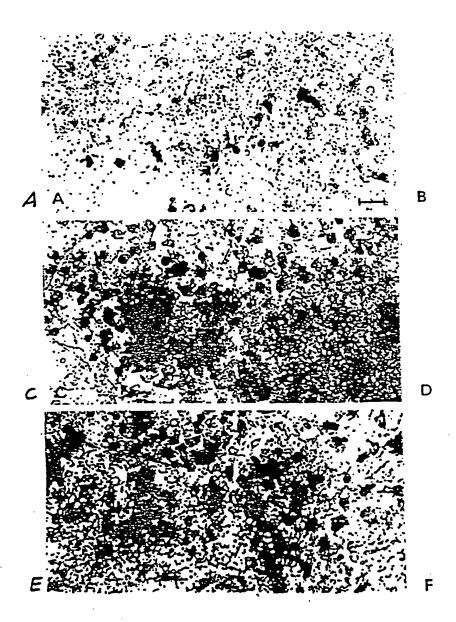


Abb. 2 fig. A, 3 fig. C, D fig. E, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int onal Application No PCT/DE 96/01183

		PCI/I	DE 96/01183
A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/	'50	
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national clas	sification and IPC	
	SEARCHED		
Minimum do IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classific ${\tt C12Q} - {\tt G01N}$	ation symbols)	
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the extent the	it such documents are included in th	ne fields searched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data t	base and, where practical, search ter	ms used)
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
Х	FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL vol. 9, no. 4, April 1995, BETH	BIOLOGY, ESDA, MD	1-6
	US, page A942 XP000196437 C-C. LAI: "Genetic engineered embryonic stem (ES) cells for t	ποuse he	
:	detection of mutation during th development" see the whole document	e early	
X	EP,A,0 370 813 (TRANSGENIC SCIE 30 May 1990 see column 1 - column 14	NCES, INC)	1-3,6
A	US,A,5 346 812 (R.W. VOELLMY ET September 1994 see the whole document	AL.) 13	1-4,6
		-/	
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members	are listed in annex.
"A" docum consider "E" earlier filing "L" docum which	nent which may throw doubts on priority daim(s) or his cited to establish the publication date of another	cited to understand the prit invention  "X" document of particular rele cannot be considered novel involve an inventive step w	connect with the application of the neiple or theory underlying the council to claimed invention of or cannot be considered to then the document is taken alone
O docum	on or other special reason (as specified)  ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or  means  ment published prior to the international filing date but	document is combined Will	eing obvious to a person skilled
later	than the priority date claimed e actual completion of the international search	Date of mailing of the inter	
	30 September 1996	1 8. 10. 96	
Name and	mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  De Kok, A	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte mal Application No PCT/DE 96/01183

		PCI/DE 30	/
C.(Continua	tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		receivant to those two
<b>A</b>	TOXICOLOGY IN VITRO, vol. 8, no. 4, 1994, OXFORD GB, pages 697-701, XP000196434 D.R. NEWALL ET AL.: "The stem-cell test: a novel in vitro assay for teratogenic potential" cited in the application see the whole document	•	1
Α .	WO,A,89 05864 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 29 June 1989 see page 11, line 12 - line 19 see page 35, line 15 - page 38, line 31	·	1,2,4
A	DD,A,299 439 (ZENTRALINSTITUT FÜR GENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG) 16 April 1992 see the whole document		. 1
Α	GENES AND DEVELOPMENT, vol. 5, no. 9, September 1991, GB, pages 1513-1523, XP000562802 G. FRIEDRICH ET AL.: "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice" see the whole document		1,3
	•		
•			
			·
	·		
			·
		•	
	•		
		•	
			<u> </u>
			<u> </u>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intr onal Application No PCT/DE 96/01183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0370813	30-05-90	CA-A- 200341 JP-A- 214520 JP-B- 603062 JP-A- 408490	00 04-06-90 23 27-04-94
US-A-5346812	13-09-94	NONE	
WO-A-8905864	29-06-89	AU-A- 290038 EP-A- 039089 JP-T- 350288	7 10-10-90
DD-A-299439	19-10-95	NONE	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte males Aktenzeichen
PCT/DE 96/01183

A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/50		
Nach der In	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla	ssifikation und der IPK	·
	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol C12Q G01N		
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	veit diese unter die recherchierten Gebiete	: fallen
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und evil. verwendete	Suchbegriffe)
C ALE W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Х	FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIO Bd. 9, Nr. 4, April 1995, BETHESDA US, Seite A942 XP000196437 C-C. LAI: "Genetic engineered mon	A, MD	1-6
	embryonic stem (ES) cells for the detection of mutation during the development siehe das ganze Dokument		
х	EP,A,O 370 813 (TRANSGENIC SCIENC 30.Mai 1990 siehe Spalte 1 - Spalte 14	ES, INC)	1-3,6
A	US,A,5 346 812 (R.W. VOELLMY ET A 13.September 1994 siehe das ganze Dokument	L.)	1-4,6
	-	/	
L ent	itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	Siehe Anhang Patentfamilie  T Spätere Veröffentlichung, die nach de	m internationalen Anmeldedatum
'A' Veröß aber 'E' älteres	Tentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist 5 Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedannn veröffentlicht worden ist	oder dem Priontatianim verotenue Anmeldung nicht kollidiert, sondern Erfindung zugrundeliegenden Prinzip Theorie angegeben ist	nur zumVerständnis des der si oder der ihr zugrundeliegenden eistung die beansuruchte Erfindun
ander	fentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besondern Grund angegeben ist (wie eführt)	kann nicht als auf erlindenscher 1 au	racinit werden eutung; die beanspruchte Erfindun gkeit beruhend betrachtet mit einer oder mehreren anderen
eine	Mentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Benutichung, die vor dem internationalen Annaldedabum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	Veröffentlichungen dieser Kategorie diese Verbindung für einen Fachman "&" Veröffentlichung, die Mitglied dersei	ben Patentfamilie ist
Datum de	s Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen R	echerchenberiens
	30.September 1996		
Name und	l Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  De Kok, A	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01183

		PC1/DE 90		
C.(Fortsetzu	ing) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kome	nenden rene		
A	TOXICOLOGY IN VITRO, Bd. 8, Nr. 4, 1994, OXFORD GB, Seiten 697-701, XP000196434 D.R. NEWALL ET AL.: "The stem-cell test: a novel in vitro assay for teratogenic potential" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		1	
A	WO,A,89 05864 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 29. Juni 1989 siehe Seite 11, Zeile 12 - Zeile 19 siehe Seite 35, Zeile 15 - Seite 38, Zeile 31		1,2,4	
A	DD,A,299 439 (ZENTRALINSTITUT FÜR GENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG) 16.April 1992 siehe das ganze Dokument		1	
A	GENES AND DEVELOPMENT, Bd. 5, Nr. 9, September 1991, GB, Seiten 1513-1523, XP000562802 G. FRIEDRICH ET AL.: "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to		1,3	
	identify and mutate developmental genes in mice" siehe das ganze Dokument			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"		·	
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			
	identify and mutate developmental genes in mice"			

1

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich.....gen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int ionales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01183

Im Recherchenbericht ungeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0370813	30-05-90	CA-A- JP-A- JP-B- JP-A-	2003415 2145200 6030623 4084900	25-05-90 04-06-90 27-04-94 18-03-92
US-A-5346812	13-09-94	KEINE		
WO-A-8905864	29-06-89	AU-A- EP-A- JP-T-	2900389 0390857 3502882	19-07-89 10-10-90 04-07-91
DD-A-299439	19-10-95	KEINE		